

Conalbumin に関する研究 (2)

金森正雄・前田一郎

M. KANAMORI and I. MAEDA: Studies on Conalbumin. 2.

I 緒 言

卵白 albumin として ovalbumin 以外に溶解し易い非結晶性 albumin の存在が古くから知られ、OSBORNE¹⁾によつて conalbumin と命名されたが、其後この蛋白については何等の研究も行はれず、1940年に至り LONGSWORTH²⁾, ALDERTON³⁾によつて超速心分離分析、電気泳動分析によつて2成分を含む Conalbumin が得られ、又 DEUTSCH⁴⁾ 及び FORSYTHE⁵⁾によつて弱アルカリ、弱酸性で酒精分別法によつて電気泳動的に単一な conalbumin を得たが、何れも結晶状には得られなかつた。1951年に至り WEBER⁶⁾は conalbumin が鉄と安定な塩を作る性質を利用して Fe-conalbumin の結晶を得て、これから鉄を除去して純粋な conalbumin の結晶を得ることに成功したのである。更に又 conalbumin と flavin 色素との結合が推定されて現在その結論が得られておらぬのであつて、DEUTSCH はこれについて次の如き推論を下している。即ち conalbumin 溶液は黄色を呈し pH 6.0 以下の酸性では黄色は消失し、pH 6.0 以上のアルカリでは黄色色素は残存し、280, 370, 450 m μ に夫々吸収を認め、riboflavin を prosthetic group とする flavoprotein であらうと推定した。又 FORSYTHE も DEUTSCH と同様に卵白中の黄色色素は conalbumin fraction 中に集中し、純粋化してゆくと大部分が flavin free の conalbumin となり、一部分のみが水に不溶の flavin を含む conalbumin となることを報告して黄色色素と conalbumin との関係は不明であつたが、筆者等⁸⁾はさきに ALDERTON の方法に準じて電気泳動的に単一な conalbumin を単離して、DEUTSCH, FORSYTHE によつて推論されていた conalbumin と flavin 色素との結合の問題を詳細研究して、conalbumin は flavoprotein であるとする DEUTSCH の説を否定して、conalbumin は全然 flavin と結合しないことを確認証明し、conalbumin と flavin 色素との関係をはつきりさせたのである。更に引續いて卵白中の flavin 色素と ovomucoid との結合の可能性を認め、これ

ついて詳細な研究を行い、同時に単離した conalbumin の modification を電気泳動分析によつて追求したので以下順を追うてこれについて記述する。

II 実験結果並びに考察

(I) Conalbumin の isolation と modification について

conalbumin を卵白から単離するとき、高濃度の硫酸を酸性で使用する一般の硫酸塩析法を採ると、本来は泳動的に homogeneous であるべき conalbumin に一定の変化が起り、電気泳動的に易動度の相違する幾つかの成分に分れる。このようにして生長した各異型 modifications はいずれも生卵白中の原型 native mode に移行することも出来て、その移行や各型の量的平衡は medium の塩類濃度やその種類、イオン強度、PH 値、温度等によつて支配されるので以下その次第を述べる。

(a) Conalbumin の調製

ALDERTON が行つた単離操作に準じて、酸性で硫酸塩析法を用いて調製したがその process は第1表の如くで単離した最終区分(粗 conalbumin 区分)は更に精製するために ppt-C 以下の操作を繰返した。全操作を通じて 2~5°C の低温を維持して単離操作を行つた。

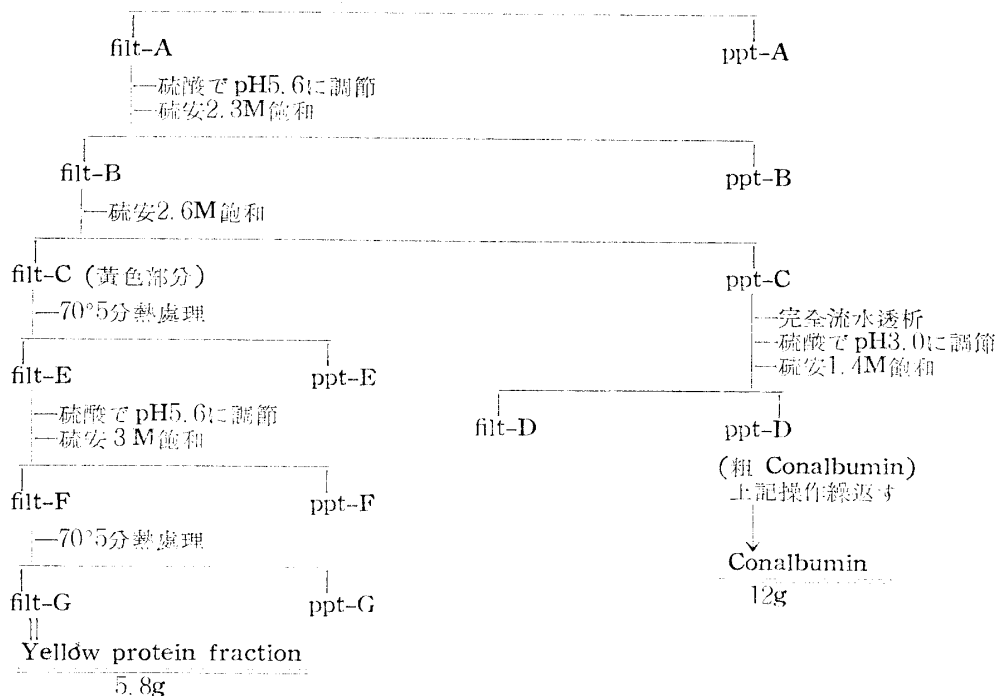
(b) Conalbumin の電気泳動

上述の塩析操作で単離した試料蛋白液を pH 4.1, 4.6, 5.6, 7.7, 8.0, 8.8, 9.6 でそれぞれ泳動させたところ、第2表及び第1図に見られる如く電気泳動的に非常に多成分的な様相を呈し、測定された易動度も多様であつた。これは単離操作のうちに生成した異型が緩衝液透析によつて原型にもどる現象の色々な段階を見せているためで、透析を徹底的に行えばこの多様性をもつと減ずると思ふされる。第2表及び第1図の中で Cm を以て表示した異型は CANN⁷⁾らが modification C₃, C₄ と呼んでいるものに相当するのであつて、異型 C₂, Cm などは酸性側で特によく残存しており、その易動度は原型 C₁ より大きい。

第1表 Conalbumin の単離

卵白 1455g

— 攪拌, 水 4200ml 添加
— 硫酸で pH6.4 に調節

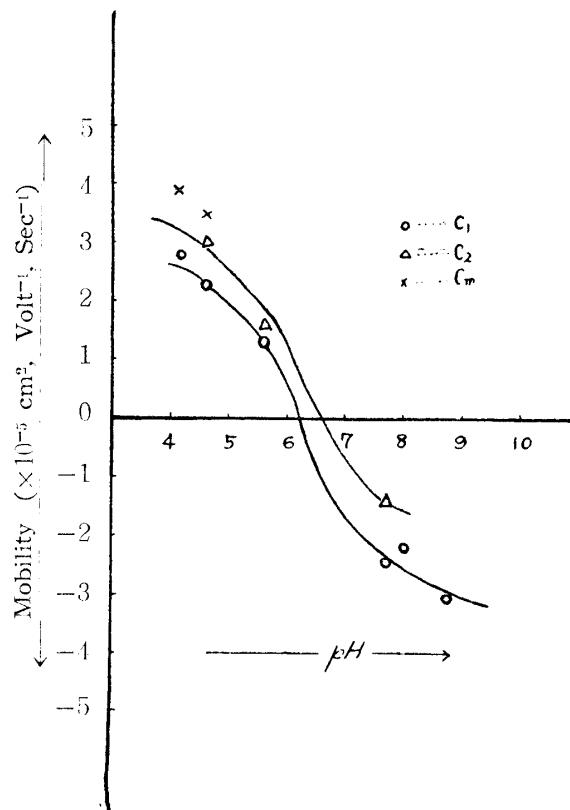


第2表

pH	Mobility ($\times 10^{-5}$ cm ² Volt ⁻¹ Sec ⁻¹)		
	C ₁	C ₂	C _m
4.1	2.77		3.93
4.6	2.26	3.02	3.47
5.6	1.34	1.60	
7.7	-2.38	-1.37	
8.0	-2.10		
8.8	-3.02		

(c) Conalbumin の酸性透析処理の影響

硫酸塩析のために生成した各種の異型は, 流水透析して無塩の溶液として保存する間は型の移行をみせないがこれを適当な緩衝液で透析すると型は次第に移行して, C_m は C₂ や C₁ に変つてゆく. C₁ は生の卵白中にあるときのものゝ易動度の点では一致する所謂原型であり, C₂ は異型の一種で酸性反応で硫酸塩析を行つたために生じた modification である. 然してこの型の移行は緩衝液の種類にもよるけれども, 前述のように可成りの時間がかかるので泳動用緩衝液にて透析する前にあらかじめ特別の処理を施した, 即ち試料を pH3.2 の glycine buffer に対して3昼夜透析し,



第1図

それに続いて泳動用の各 pH の緩衝液に対する透析を従来通りに行つた. かくして生成された試料を電気泳

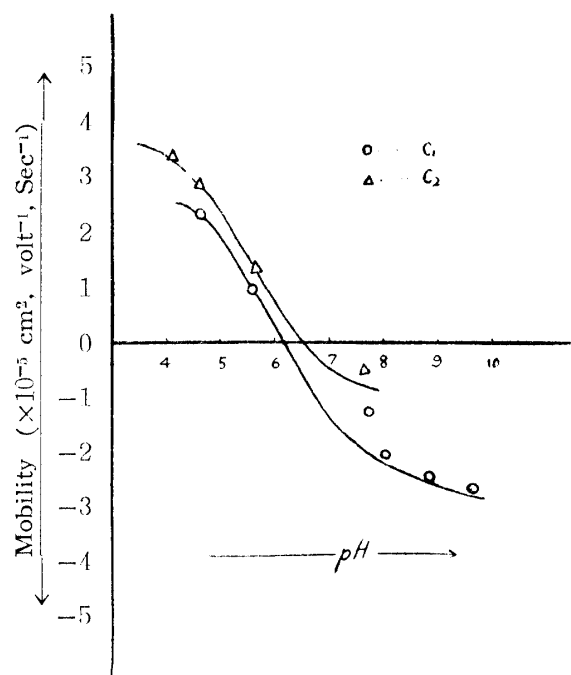
第 3 表

pH	Mobility ($\times 10^{-5}$ cm ² Volt ⁻¹ Sec ⁻¹)	
	C ₁	C ₂
4.1		3.47
4.6	2.40	3.00
5.6	1.03	1.38
7.7	-1.25	-0.47
8.0	-2.03	
8.8	-2.50	
9.6	-2.59	

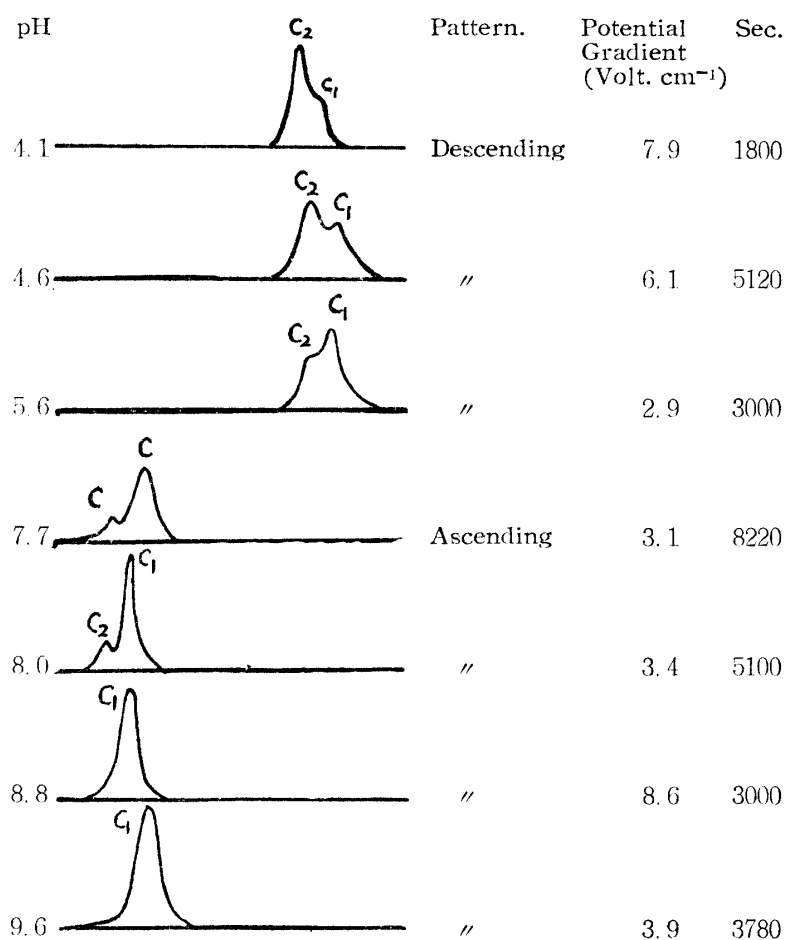
動分析した結果は第3表及び第2図に示した如くであつて、この結果からわかるごとくに C₁ と C₂ とでは C₁ の方が易動度が小さいのであつて、C₂ は中性からアルカリ側へかけてその存在が殆どみとめられない。C₁ と C₂ とのこの組成関係は pH によつて決る量的平衡があり、酸性側では C₂ が、塩基性側では C₁ がその主要成分となつている。これらの量的関係を示すために各 pH に於ける泳動像の代表的なものを第3図に図示し、それぞれの成分組成を比較してみると C₂ の占める割合は pH の高い程著しく少なくなつてゐる。尚 C₁ と C₂ それぞれの易動度と pH との関係から挿入法で概算してみた等電点は C₁=pH6.2, C₂=pH6.6 ぐらいであつた。

(d) Conalbumin の塩基性透析処理の影響

酸性処理に代えて、泳動前にアルカリ性処理を行つた場合どのような影響があるかを検討した。試料溶液をはじめに pH 11.1 の carbonate-borate buffer に3晝夜透析した後、各々の泳動条件に相当する pH の各緩衝液に透析し電気泳動分析を行つた。測定した易動度と pH との関係は第4表及び第4図に示した如くであつた。又第5図にみられるように異型 Cm がまだ組成の主要な一部分を占めており、アルカリ側ではそれが殊に著しい結果を得た。この場合には C₂ に相当すると思考される成分は見出すことが出来なかつた。



第 2 圖



第 3 圖

第 4 表

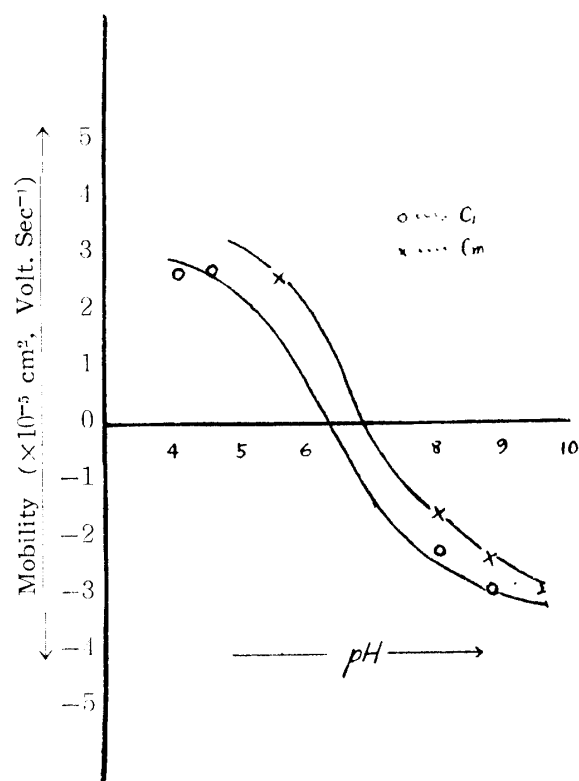
pH	Mobility ($\times 10^{-5}$ cm ² Volt ⁻¹ Sec ⁻¹)	
	C _m	C _i
4.1		2.26
4.6		2.29
5.6	2.15	
7.7		
8.0	-1.40	-2.02
8.8	-2.06	-2.53
9.6	-2.61	

(II) 黄色色素蛋白について

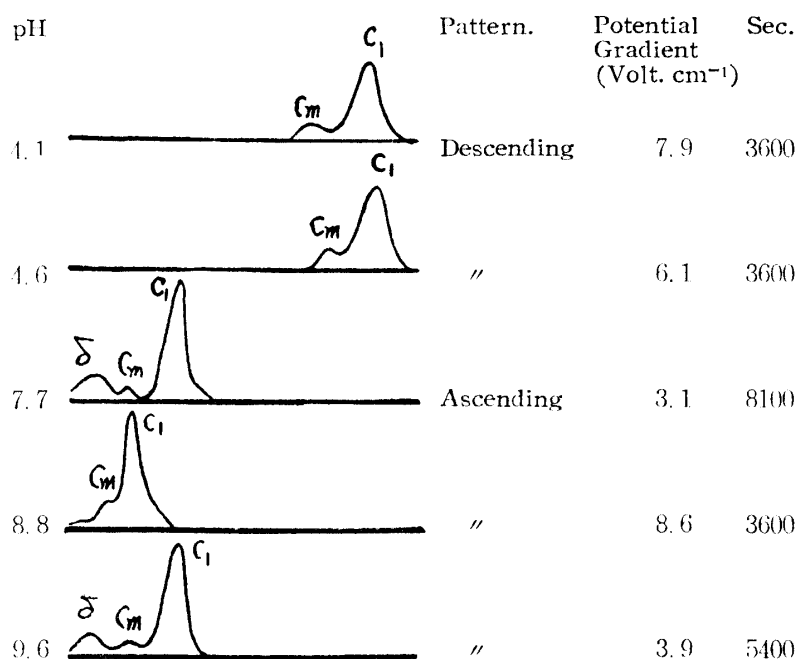
第1表に示したごとく ALDERTON の方法に準じて数回処理を繰返して純粋な conalbumin を得れば、卵白中の黄色色素は conalbumin fraction 中には移行せず、濾液の方へ移行するのである。次にこの黄色色素濾液を pH 3.0 で透析して黄色色素を透析膜外へ出し、膜内に得られた無色の蛋白に透析膜外へ出た黄色色素、ビタミンB₂及び FMN(flavin mononucleotide) を夫々中性で結合させたところ、蛋白はこれらの flavin 色素と堅く結合したのであるが、純粋な ovalbumin 及び conalbumin について同様の実験を行つたが、この両蛋白は flavin 色素とは全然結合しなかった。

次に黄色色素並に B₂, FMN と結合し得る黄色色素蛋白の電気泳動分析を行つたところ第6図の如き結果を得て大部分の ovomucoid と ovalbumin 及び conalbumin とから成つておることがわかつた。この泳動結果とさきの flavin 色素との結合実験結果から判断すれば黄色色素 B₂ 乃至 FMN と結合する蛋白は ovomucoid であらうと推定されるのである。従つて次に ovomucoid の特性を用いて第1表にみられるごとく熱処理と硫酸分別処理を再三繰返して conalbumin 及び ovalbumin を除去してゆき最後に得られた黄色色素蛋白 (Y) 及びこの色素蛋白から黄色色素を除去して得られた蛋白 (Y. P.) の電気泳動図は第7図に示した如くであつて、蛋白に対する硫

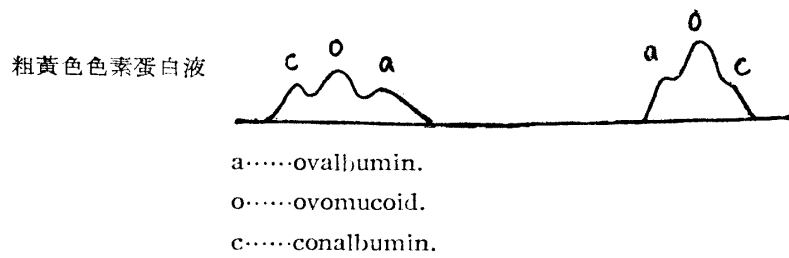
安塩析の様相及びその易動度からこの蛋白は ovomucoid と判断出来る。尚 Y の泳動下降界面が2成分に分かれるのは黄色色素と蛋白質との典型的な interaction を示すものであつて、この関係は更に又第8図にみられる濾紙電気泳動図からも判断されるのであ



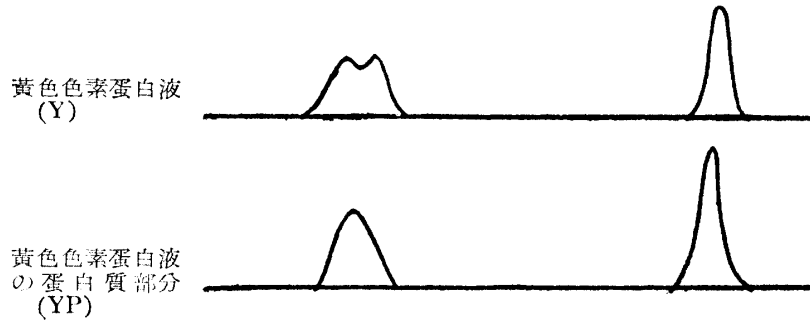
第 4 圖



第 5 圖



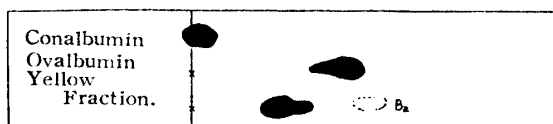
第 6 圖



泳動条件: pH 8.0 $r/2=0.1$ Phosphate buffer
4°C 7920秒, 電位勾配 3.7Volt cm^{-1}
易動度: $-4.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2, \text{ Volt}^{-1}, \text{ Sec}^{-1}$

第 7 圖

る。以上の実験結果から黄色色素乃至 flavin 色素は ovomucoid と結合することが確認されたのであつて、従来から conalbumin と flavin 色素が結合すると推論されていたのは、conalbumin 中に不純物として存在する ovomucoid と flavin 色素が結合したためと解されるのであつて、conalbumin を純化してゆくと黄色色素は不溶性の蛋白質部分に移行してゆくという



泳動条件: pH 8.6 $r/2=0.045$ Veronal buffer
250 Volt, 0.6mA BPB 呈色.

第 8 圖

第5表 Riboflavin. Y 及び YP+B₂ の
Molecular Extinction Coefficient.

$m\mu$	B ₂	Y	YP+B ₂
510	0.4	—	—
450	12.2	0.335	1.120
375	10.6	0.341	0.980
260	27.7	—	—

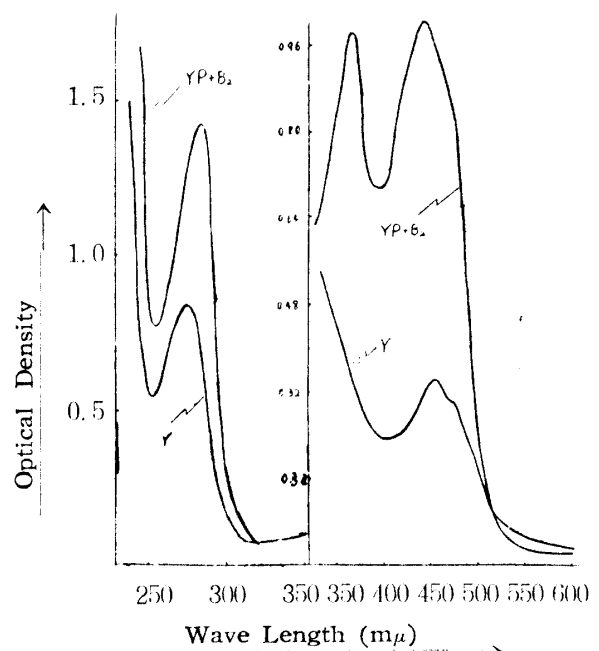
単位 $1. \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 10^{-3}$

FORSYTHE の実験結果を良く説明出来る。

次に flavin 色素と ovomucoid との結合比率について実験したところ、第5表及び第9図に示した如き結果を得たのであつて、この結果から計算によつてその結合割合を求めてみれば ovomucoid 1 mol当り黄色色素蛋白 Y 及び黄色色素蛋白の蛋白質部分に B₂ を結合させた YP+B₂ では夫々 1mol 及び 4mol であつた。

更に黄色色素蛋白の色素部分の形態を知るために次の実験を行つた。Y を 80°C, 15分熱処理して醋酸で pH 5.0 となして硫酸で完沈して得られた濾液に phenol を添加振盪して phenol 溶液に黄色色素を移行させ、これにエーテルを添加して分液すれば黄色色素は水

層に移行するのでこれを濃縮して、Lutidine 及び Benzylalcohol の two solvent を用いて、対照試料とに B₂, FAD, (flavin adenin dinucleotide), FMN を用いてペーパークロマトグラフィを行つた。このクロマトから Y から得られた flavin 色素は遊離の B₂ であることがわかり前報の結果と良く一致した。尚又 Y 中に含まれる磷酸を定量したところ皆無で ovomi-



第 9 圖

ucoid と結合している flavin 色素は遊離の B_2 であることが確認出来た。自然界では動物臓器以外は FMN の含量は極めて少く、殆ど B_2 (遊離) か FAD の形で存在しており、遊離 B_2 との結合は何等不思議ではないのであるが、その ovomucoid との結合形態については尙実験を要するところであつて目下研究中であり、別の機会に報告する。

III 要 約

(1) Conalbumin は硫酸塩析法によつて酸性で単離した場合、単離の操作のうちに生の卵白では認めることのできないいくつかの modification を形成し、その modification はいずれも medium の pH 値によつて他の型へ移行する可能性をもっている。

(2) modification の各々を夫々 C_1 , C_2 , C_m と名付けると、 C_1 は電気泳動的に生卵白中の Conalbumin と同じ行動をする。

(3) C_m は pH3.1乃至 pH7.7の緩衝液で透析すると、次第に C_1 又は C_2 に移行するのであるが、この透析は pH があまり高いと効果が少い。

(4) C_1 と C_2 との成分組成は pH に関する量的平衡を保ち pH が低い時は C_2 が、高い時は C_1 が夫々大きい組成を占め、等電点は C_1 =pH6.2, C_2 =pH6.6であつた。

(5) Ovomucoid は黄色色素 (flavin 色素) と結合する性質を有することを確認した。

(6) 卵白の黄色色素蛋白の黄色色素は free のribo-

flavin であり、その蛋白部分は ovomucoid であることを分光分析、電気泳動分析、ペーパークロマトによつて確認した。

(7) Ovomucoid と flavin 色素との結合割合は、卵白から分別した黄色色素蛋白では ovomucoid 1 mol 当り riboflavin 1 mol であつたが、ovomucoid と riboflavin を結合させると最高 1 mol 対 4 mol の割合で結合することを確認した。

文 献

- (1) T. B. OSBORNE : *J. A. C. S.* **21** 477 (1899).
T. B. OSBORNE and G. E. COMPELL : *J. A. C. S.* **22** 422 (1900).
- (2) L. G. LONGSWORTH, R. K. CANNAN and D. A. MAC INNES : *J. A. C. S.* **62** 2580 (1940).
- (3) G. ALDERTON; W. H. WARD and H. L. FEVOLD : *Arch. Biochem.* **11** 9 (1946).
- (4) J. A. BAIN and H. F. DEUTSCH : *J. B. C.* **172** 517 (1948).
- (5) R. H. FORSYTHE and J. F. FOSTER : *J. B. C.* **184** 377, 385 (1950).
- (6) R. C. WARNER and I. WEBER : *Federation Proc.* **9** 243 (1950).
———, ——— *J. B. C.* **191** 173 (1951).
- (7) J. R. CANN and R. A. PHELPS : *Arch. Biochem. et Biophys.* **52** 48 (1954).
- (8) 金森, 前田 : 日本農芸化学会誌投稿中。

Summary

1) Isolated conalbumin, prepared by the ammonium sulfate fractionation procedure over the acid range, gave varying modifications, most of which would be not detected in native egg white. These modifications were able to be transformed one another depending on the pH, to which they had been subjected.

2) The modification C_1 behaved electrophoretically as the native conalbumin in egg white.

3) The modification C_m would be transformed into C_1 or C_2 during dialysis at pH 3.1 to 7.7. This transformation was not so effective at some higher pH values.

4) The component parts of C_1 and C_2 were depend upon pH of their medium; C_1 represented the main component over the higher pH range,

while, C_2 over the lower. The isoelectric points of C_1 and C_2 determined from the pH-mobility curves were at pH 6.2 and 6.6 respectively.

5) We have recognized that yellow pigment of yellow protein fraction in egg white is riboflavin and the protein of it, is ovomucoid and ovomucoid combine with riboflavin, by means of spectrophotometric, electrophoretic and paper-chromatographic analysis.

6) Isolated yellow protein fraction, prepared by the ammonium sulfate fractionation from egg white, contained ovomucoid and riboflavin in a ratio of 1 mol : 1 mol, and the ovomucoid of egg white had a capacity of combination with riboflavin in a max ratio of 1 mol : 4 mol.